

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

CLÁUDIA LIZ RODRIGUES SILVA

***CRYPTOCOCCUS* SPP. EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DE CAMPO
GRANDE-MS: TIPAGEM MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

CAMPO GRANDE

2022

**CRYPTOCOCCUS SPP. EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DE CAMPO GRANDE-
MS: TIPAGEM MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Saúde e Sociedade.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE

2022

A Deus.

A minha família por tanto apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado em todas as fases que passei até aqui.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang, por tanto esforço, paciência e dedicação para a realização deste projeto, agradeço sua orientação e oportunidade de fazer uma pós-graduação.

À minha mãe Elizabeth, ao meu pai Cláudio, à minha família e namorado Malcolm, por tanto carinho e por sempre acreditarem em mim.

À mestre Nayara Moreno Martins técnica do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas - UFMS, por todo auxílio prestado, essencial para realização desse trabalho.

À Maína Nunes do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário da UFMS, pelo esclarecimento de dúvidas e toda ajuda fornecida.

À companheira de mestrado Amanda Borges Colman pelo acompanhamento nas técnicas de biologia molecular e acompanhamento em todo o trabalho.

À minhas amigas e companheiras de mestrado do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas, Suellen Raquel da Silva Ferreira, Michele Scardine Corrêa de Lemos, Denise Leime Di Raimo e Daniele Cristina Vitorelli Venancio, pela ajuda, apoio, convivência e aprendizado.

À Secretaria Municipal de Saúde pela autorização da realização dessa pesquisa e todos os gestores municipais e responsáveis pelas Unidades Básicas de Saúde, pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pela oportunidade.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica e oportunista, adquirida pela inalação de partículas fúngicas infecciosas dispersas no ambiente. Os agentes etiológicos da doença são leveduras capsuladas pertencentes aos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Excrementos de aves, principalmente pombos (*Columba livia*) são considerados vetores mecânicos de *Cryptococcus* spp. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Cryptococcus* spp. em amostras de excrementos de pombos presentes em 27 Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Campo Grande, Mato Grosso do Sul; identificar o tipo molecular e determinar sua susceptibilidade frente a antifúngicos. As coletas foram realizadas utilizando espátulas para raspagem do material e armazenadas em coletor universal estéril. As leveduras foram identificadas por meio de técnicas fenotípicas (cultivo em ágar semente de níger, ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol – CGB e urease) e genotípicas (PCR-RFLP do gene *URA5*). A susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol foi determinada pelo método de microdiluição em caldo padronizado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Um total de 354 amostras de excrementos de pombos foram coletadas em 27 UBS distribuídas nas sete macrorregiões da cidade. Em 12 amostras foram isoladas *Cryptococcus* do complexo *C. neoformans*, tipo molecular VNI. Todos foram sensíveis aos antifúngicos testados. *Cryptococcus neoformans*, VNI, o tipo molecular mais prevalente em casos de criptococose na região Centro Oeste do Brasil, está presente em excrementos de pombos de unidades que prestam atendimentos básicos de saúde. Medidas de controle são necessárias para diminuir a exposição de pessoas suscetíveis e servidores públicos municipais aos propágulos infecciosos deste importante fungo oportunista.

Descritores: criptococose; *Cryptococcus neoformans*; *Columba livia*; concentração inibitória mínima; postos de saúde.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic and opportunistic fungal disease acquired by inhaling infectious fungal particles dispersed in the environment. The etiological agents of this disease are encapsulated yeasts that belong to the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* complexes. Avian feces, especially pigeons (*Columba livia*) are considered to be mechanical vectors of *Cryptococcus* spp. The objective of this study was to investigate the presence of *Cryptococcus* spp. in samples of pigeon droppings from 27 Basic Health Units (BHU) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul; identify the molecular type and determine its susceptibility to antifungals. The collections were performed using spatulas to scrape the material and then stored in a sterile universal collector. The yeasts were identified by phenotypic (culture on Niger seed agar, canavanine-glycine-bromothymol blue agar - CGB and urease) and genotypic (PCR-RFLP of *URA5* gene) techniques. Susceptibility to the antifungals amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole was determined by the broth microdilution method standardized by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. A total of 354 samples of pigeon droppings were collected in 27 UBSs distributed in the seven macroregions of the city. *Cryptococcus* of the *C. neoformans* complex, molecular type VNI, were isolated in 12 samples. *Cryptococcus neoformans*, VNI, the most prevalent molecular type in cases of cryptococcosis in the Midwest region of Brazil, is present in pigeon droppings of units providing basic health care. Control measures are necessary to decrease the exposure of susceptible people and municipal civil servants to the infectious propagules of this important opportunistic fungus.

Descriptors: Cryptococcosis; *Cryptococcus neoformans*; *Columba livia*; Minimal Inhibitory Concentration; Health Centers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa ilustrando sete macroregiões do município de Campo Grande – MS.....	22
Figura 2	Distribuição espacial das 27 Unidades Básicas de Saúde (UBS) de onde foram coletadas as amostras de excrementos de pombos. Campo Grande – MS.....	23
Figura 3	A Fotos ilustrando procedimento de coleta de excrementos de pombos. B e C. Alguns locais de coleta.....	24
Figura 4	A - Colônias de diferentes espécies de fungos da primeira semeadura em ágar semente de Níger. B - Obtenção de colônias puras de <i>Cryptococcus</i> spp.....	25
Figura 5	A - Teste da urease, ilustrando o resultado positivo (rosa) e negativo (amarelo). B - Teste de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), ilustrando a diferença entre os complexos <i>C. neoformans</i> (verde) e <i>C. Gattii</i> (azul cobalto).....	26
Figura 6	Parâmetros utilizados na programação do termociclador na reação de PCR para amplificação do gene <i>URA5</i> (\cong 750 pb).....	28
Figura 7	Fluxograma ilustrando o número de amostras coletadas e a frequência de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados de excrementos de pombos em dois períodos de estudo (outubro a dezembro 2018/ fevereiro de 2021 a fevereiro 2022), Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS.....	32
Figura 8	Distribuição espacial de macrorregiões de Campo Grande-MS ilustrando Unidades Básicas de Saúde com amostras (excrementos de pombos) positivas para <i>Cryptococcus</i> spp.....	33
Figura 9	Resultados da identificação fenotípica no meio CGB e molecular por PCR-RFLP (<i>URA5</i>).....	34
Figura 10	Perfil representativo de RFLP-URA5 de <i>Cryptococcus neoformans</i> após a digestão das enzimas de restrição HhaI e Sau96I.....	34
Figura 11	Distribuição de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados de fontes ambientais no Brasil.....	36
Figura 12	Distribuição geográfica dos tipos moleculares de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na América Latina.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de referência de concentração inibitória mínima utilizados na interpretação dos resultados do teste de susceptibilidade antifúngica.	30
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) de quatro agentes antifúngicos frente a <i>C. neoformans</i> VNI isolados de excrementos de pombos em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS - outubro/dezembro 2018 e fevereiro 2021-2022 (n=12).....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Aspectos históricos da criptococose e de seus agentes etiológicos	13
2.2	Nichos ecológicos de <i>Cryptococcus</i> spp.	14
2.3	Epidemiologia da criptococose.....	15
2.4	Fatores de virulência	17
2.5	Antifúngicos utilizados no tratamento da Criptococose.....	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Tipo de pesquisa.....	21
4.2	Locais de pesquisa.....	21
4.3	Período de pesquisa.....	22
4.4	Procedimentos de coleta	22
4.5	Processamento das amostras.....	23
4.6	Cultivo de amostras e identificação fenotípica.....	24
4.7	Tipagem molecular.....	26
4.7.1	<u>Extração de DNA</u>	26
4.7.2	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e reação de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição(RFLP)</u>	26
4.8	Teste de susceptibilidade a antifúngicos.....	28
4.8.1	<u>Preparo de soluções estoque</u>	28
4.8.2	<u>Preparação das placas de microdiluição</u>	28
4.8.3	<u>Preparação do inóculo</u>	29
4.8.4	<u>Leitura das placas de microdiluição</u>	29
5	Considerações éticas.....	30
6	RESULTADOS	31
7	DISCUSSÃO	35
8	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO A – Autorização legal da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.....	56

1 INTRODUÇÃO

Criptococose é uma doença fúngica sistêmica e oportunista, que tem como agentes etiológicos os complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2017). O complexo *Cryptococcus neoformans* é constituído das espécies *C. neoformans* e *C. deneoformans*, e o complexo *Cryptococcus gattii* pelas espécies *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (HAGEN *et al.*, 2015).

Os agentes da criptococose são leveduras que podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos como excretas de aves, principalmente *Columba livia* (pombos), ocos de árvores, frutas, solo, insetos, água, ar e em alguns mamíferos (COGLIATI, 2013; COGLIATI *et al.*, 2016; KAMARI, SEPAHVAND, MOHAMMADI, 2017; EDWARDS *et al.*, 2021).

A infecção normalmente ocorre por meio da inalação de esporos presentes no ambiente. Do pulmão os fungos podem se disseminar para outros tecidos com tropismo pelo sistema nervoso central, onde causa meningoencefalite (WALSH *et al.*, 2019).

Cryptococcus neoformans afeta mais frequentemente indivíduos com comprometimento da imunidade celular, como na aids (BASTOS *et al.*, 2022; SANTOS e FIGUEIREDO, 2021), bem como indivíduos com outras condições predisponentes como aqueles em uso de medicamentos imunossupressores, com diabetes mellitus, neoplasias, hanseníase e outras comorbidades (BASTOS *et al.* 2022; FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021). Por outro lado, a infecção por *C. gattii* ocorre predominantemente em indivíduos aparentemente imunocompetentes (TRILLES *et al.*, 2008).

Brasil e Colômbia são os países da América Latina com maior incidência de criptococose com cerca de 1001 a 2500 casos por ano (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

Estudos que descrevem isolados ambientais de *Cryptococcus* e sua correlação com isolados clínicos são pouco descritos no Brasil (FARIA *et al.*, 2010; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2012; SPINA-TENSINI *et al.* 2017; ANDRADE- SILVA *et al.*, 2018).

O isolamento de *Cryptococcus* de amostras clínicas é um fato comum e já foi documentado em todos os estados brasileiros (FIRACATIVE *et al.*, 2018; CARMO *et al.*, 2022). Entretanto, estudos com isolamento dos agentes da criptococose de

amostras ambientais tem se concentrado principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (MATSUMOTO *et al.*, 2007; CARMO *et al.*, 2022), Nas regiões Norte e Centro-Oeste existem poucos dados publicados (FILIÚ *et al.*, 2002; FAVALESSA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2013; TSUJISAKI *et al.*, 2013; FIRACATIVE *et al.*, 2018; CORRÊA-JUNIOR, 2019).

A identificação molecular dos complexos de espécies *C. neoformans/C. gattii*, auxilia no entendimento das diferenças de distribuição geográfica das espécies, genética de populações, ecologia, virulência, manifestações clínicas e susceptibilidade antifúngica, dessa forma, é também de suma importância para decidir sobre opções de tratamento para criptococose e entender as possíveis razões para seu surgimento e expansão em outras regiões do mundo (CARMO, 2021; FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2022).

O conhecimento do perfil de susceptibilidade a antifúngicos de isolados de *Cryptococcus* se faz importante pela detecção/monitoramento de resistência antifúngica, auxilia na escolha de terapias antifúngicas eficientes e previsão de falência terapêutica (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013, TAHA *et al.*, 2020).

Em razão da escassez de estudos na região Centro-Oeste do Brasil e a presença de pombos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) que pode ser condição de risco para aquisição da criptococose, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Cryptococcus* spp. em amostras de excrementos de pombos presentes em UBS de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, determinar os tipos moleculares e a susceptibilidade frente a antifúngicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos históricos da criptococose e de seus agentes etiológicos

A primeira descrição da doença aconteceu em 1894, pelo patologista Otto Busse e pelo cirurgião Abraham Buschke, os quais isolaram uma levedura semelhante a *Saccharomyces* de um granuloma crônico do osso tibial em uma paciente (DINIZ-LIMA *et al.*, 2022). A princípio, a levedura isolada foi denominada de *Saccharomyces hominis* (HEITMAN *et al.*, 2011; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014), e posteriormente, o cientista Francesco Sanfelice isolou uma levedura semelhante do suco de pêsego, e a denominou de *Saccharomyces neoformans* devido a formação característica de sua colônia (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Este achado mostrou que a levedura não era encontrada somente como patógeno humano.

Posteriormente, em 1901, Jean-Paul Vuillemin renomeou as leveduras de Busse e de Sanfelice como *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (BARNETT *et al.*, 2010; HEITMAN *et al.*, 2011).

Mais tarde, em 1935, a botânica Rodha Benham nomeou diversas leveduras que pertenciam à mesma espécie com nomes diferentes, sugerindo *Cryptococcus neoformans* como a única espécie, e mais tarde em 1952, *C. neoformans* sugerido por Benham foi adotado por Lodder e Kreger-van Rij em um estudo taxonômico que incluiu todas as leveduras conhecidas até então (BARNETT *et al.*, 2010).

A partir de ensaio de aglutinação de sorotipos, *Cryptococcus neoformans* foi dividido em sorotipos A (equivalente a variante *grubii*), D e híbridos AD, enquanto *C. gattii* nos sorotipos distintos B e C (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; LIN; HEITMAN, 2006).

Com o uso de métodos moleculares nova classificação foi proposta, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, passou a ser classificado como uma espécie distinta, denominado *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG, *et al.*, 2002).

As espécies de *Cryptococcus* foram agrupadas de acordo com o sorotipos e o tipo molecular. Assim, *C. neoformans* do sorotipo A (*Cryptococcus* var. *grubii*), podem apresentar os tipos moleculares VNI, VNII e VNB (LITVINTSEVA *et al.*, 2006, MEYER *et al.*, 2010), e aqueles do sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*) é representado pelo tipo molecular VNIV. O híbrido entre ambas as variedades – sorotipo AD com o tipo molecular VNIII (MEYER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012). Ademais, *Cryptococcus gattii* do sorotipo B pode podem apresentar os tipos moleculares VGI e VGII, enquanto os

representantes do sorotipo C são VGIII e VGIV (MEYER *et al.*, 2003; FRASER *et al.*, 2005; MEYER *et al.*, 2010; HAGEN *et al.*, 2012). Recentemente, foi descrito o tipo molecular VGV, em *C. gattii* isolado em Moçambique, no continente Africano (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2021).

O gênero *Cryptococcus* pertence ao Filo Basidiomycota, é composto por mais de 100 espécies distribuídas no ambiente, sendo comumente conhecido como patógenos humanos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Hagen e colaboradores (2015) classificaram os agentes etiológicos da criptococose em sete espécies novas: *C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuteroformans*, *C. tetragattii*, e *C. decagattii*. Posteriormente, Kwon-Chung e colaboradores (2017) propôs o termo “Complexo de espécies”, englobando as espécies já classificadas e as futuras.

2.2 Nichos ecológicos de *Cryptococcus* spp.

Os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* possuem nichos ecológicos diferentes, apesar de, às vezes, haver sobreposição de nichos. Em sua maioria, *C. neoformans* é associado a excrementos fecais de aves, incluindo psitacídeos, galinhas, perus, mas principalmente, a pombos (*Columba livia*) (RATHORE *et al.*, 2022). Leveduras deste complexo também estão ligadas a outras fontes como mamíferos de vida livre, animais domésticos, poeira e há também descrição de isolamentos em diferentes espécies de árvores (LAZÉRA *et al.*, 2000; COGLIATI *et al.*, 2020; DANESI *et al.*, 2021).

Os isolados de *C. gattii* estão fortemente ligados a várias fontes arbóreas como por exemplo, *Eucalypto* spp. e *Syzygium cumini* (RATHORE *et al.*, 2022), mas também possui algumas descrições em aves (SIQUEIRA *et al.*, 2022). *Cryptococcus* do complexo *C. gattii* tem sido mais descrito em regiões tropicais e subtropicais.

Dados da literatura mostram que os pombos atuam como bioindicadores de qualidade ambiental negativa e são apontados como praga urbana. Prejuízos de ordem estética e econômica têm sido relacionados à presença dessas aves (MASCARENHAS; BELGAS, 2018). Há evidências de que a acidez de seus excrementos causa a deterioração de edifícios. O sucesso adaptativo dos pombos no ambiente urbano incluindo prédios, praças públicas, igrejas entre outros é devido a possibilidade de abrigo e a disponibilidade de alimento, os quais favorecem a sua

habitação e reprodução (FARIA *et al.*, 2010).

Algumas estratégias de controle populacional a estas aves tem sido propostas, como por exemplo: superfícies anti-pouso, substâncias paralisantes, barreiras físicas (redes, telas, cercas e pontas metálicas), espanto sonoro, espanto visual, educação ambiental e mudança ambiental (redução de oferta de alimento e de locais para poleiro e nidificação) (LABANHARE; PERRELLI, 2007).

De acordo com a instrução normativa do IBAMA nº141, de 19 de dezembro de 2006, as populações de pombos (*Columba livia*) são consideradas espécies sinantrópicas e podem ser declaradas nocivas pelos órgãos federais ou estaduais do meio ambiente. Essas aves são espécies passíveis de controle por órgãos de governo de saúde, da agricultura e do meio ambiente, sem a necessidade de autorização por parte do IBAMA, desde que não ocorra a remoção ou eliminação direto dos espécimes (IBAMA, 2006).

O contato das aves com o agente etiológico da criptococose no ambiente decorre do transporte externo em bicos e garras e também o transporte interno quando há a ingestão da matéria vegetal contaminada (SETHI; RANDHAWA, 1968; ABOU-GABAL; ATIA, 1978; ROSARIO *et al.*, 2005). As fezes acumuladas pelas aves (guano) são um ótimo meio de crescimento para *Cryptococcus* e meio de transporte do agente, ligado a dispersão dos esporos pelo ar. Os macrófagos aviários, ao contrário dos mamíferos, são capazes de suprimir o crescimento do *Cryptococcus*, através do aumento de temperatura corporal e as células criptocócicas em resposta a alta temperatura alargam sua célula protetora além de escapar das células aviárias por meio de “vomocitose” (JOHNSTON; VOELZ; MAY, 2016). Além disso, como o animal não é afetado pelo fungo supõe-se que o trato gastrointestinal tenha atividade antifúngica (MAYER; KRONSTAD, 2019).

2.3 Epidemiologia da criptococose

A criptococose é globalmente distribuída, sendo endêmica no nordeste do Brasil, Paraguai, México, Austrália, Índia, Sudeste Asiático, Europa, Califórnia e vários países Africanos (LEIMANN; KOIFMAN, 2008). *Cryptococcus neoformans* atinge principalmente pacientes imunocomprometidos, sendo predominante em pessoas que vivem com HIV/aids, responsável por 15% da mortalidade anual associada à aids, com incidência global variando de 0,04 a 12% ao ano entre pessoas com HIV (PARK

et al., 2009, RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Por outro lado, infecção criptocócica atinge também indivíduos imunocompetentes, e já chamou atenção com surtos ocorridos na América do Norte conhecido como surto do Noroeste do Pacífico e surto causado por *C. gattii*, tipo molecular VGII ocorrido na Ilha de Vancouver-Canadá (KIDD *et al.*, 2004; FRASER *et al.*, 2005).

As doenças causadas pelos patógenos *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, matam mais de 180.000 humanos por ano (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

No Brasil, um estudo epidemiológico entre os anos 2000 e 2012, registrou 5.755 mortes, no qual 19,5% dos casos, criptococose foi considerada a causa básica de morte e em 75% estava associada a aids (SOARES *et al.*, 2019).

As maiores taxas de mortes relacionadas à criptococose são descritas nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (SOARES *et al.*, 2019; CARMO *et al.*, 2022). Alguns estudos mostram uma maior incidência da doença e maior gravidade dos sintomas em indivíduos do sexo masculino, com e sem aids (MCCLELLAND *et al.*, 2013; MADURO *et al.*, 2015; LIN; SHIAU; FANG, 2015).

Estudo realizado por Guess e colaboradores (2019), sugere que as células mononucleares sanguíneas periféricas de machos apresentam um déficit inerente na resposta celular T durante a infecção, o que pode contribuir para o aumento da incidência da doença no sexo masculino.

Criptococose associada à AIDS tem sido mais descrita em pacientes na faixa etária de 20 a 59 anos (SOARES *et al.*, 2019).

Estudo de Firacative e colaboradores (2018) descreve os tipos moleculares de *Cryptococcus* associados a criptococose na América Latina. Resultados deste estudo mostram que o México é o único país onde todos os tipos moleculares têm sido relatados, enquanto no Brasil e Argentina apenas *C. gattii*, VGIV parece estar ausente.

Estudos prévios realizados em Mato Grosso do Sul, confirmam que o genótipo mais prevalente na região é *C. neoformans* VNI, seguido de *C. neoformans* VNII e *C. gattii* VGII (PASA, 2011; TSUJISAKI, 2013; NUNES *et al.*, 2018; TSUJISAKI, 2019).

O isolamento de *Cryptococcus* de amostras clínicas é um fato comum e já foi documentado em todos os estados brasileiros (CARMO *et al.*, 2022). Entretanto, estudos com isolamento dos agentes da criptococose de amostras ambientais tem se concentrado principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (CARMO *et al.*, 2022; MATSUMOTO, *et al.*, 2007). Nas regiões Norte e Centro-Oeste existem poucos dados publicados (FILIÚ *et al.*, 2002; FAVALESSA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2013;

TSUJISAKI *et al.*, 2013; CORRÊA-JUNIOR, 2019).

Isolados ambientais de *Cryptococcus* já foram identificados nas cinco regiões do país (LAZÉRA *et al.*, 1998; MONTENEGRO; PAULA, 2000; LAZÉRA *et al.*, 2000; FILIÚ *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009a; PASA, 2011; ANZAI *et al.*, 2014; ALVES, *et al.*, 2016; CORRÊA-JUNIOR, 2019).

Na região Centro-Oeste, mais especificamente na cidade de Campo Grande-MS, *Cryptococcus* spp. foram isolados em amostras de excretas de aves de cativeiro, excretas de pombos (*Columba livia*) encontradas em escolas, poeira e solo domiciliar, detritos vegetais em oco de árvore e madeiras para lenha (FILIÚ, *et al.*, 2002; PASA, 2011; ANZAI, *et al.*, 2014; CORRÊA-JUNIOR, 2019).

Embora não seja listada nem pela Organização Mundial da Saúde (OMS) nem pela PLOS Neglected Tropical Diseases (PLOS NTDs) como uma doença tropical negligenciada (DTN), a criptococose está entre uma das doenças mais negligenciadas e mal financiadas, de acordo com o Global Funding of Innovation for Neglected Diseases. (RODRIGUES, 2016). Contudo, a meningite criptocócica atende as exigências para ser uma DTN; os agentes infecciosos infectam principalmente populações residentes em áreas tropicais e subtropicais; é sujeita de eliminação, erradicação ou amplo controle (MOLLOY *et al.*, 2017; RODRIGUES, 2018).

2.4 Fatores de virulência

A infecção por *Cryptococcus* ocorre pela inalação de propagulos fúngicos, ou seja, esporos dessecados dispersos no ambiente. No pulmão, os alvéolos cobertos por macrófagos alveolares, são responsáveis pela fagocitose e tentam eliminar o fungo, além do mais, células dendríticas e linfócitos (CD4 e CD8) são recrutadas para este órgão (ZARAGOZA, 2019).

Para resistir à resposta imune do hospedeiro, como qualquer patógeno microbiano, a sobrevivência de *Cryptococcus* envolve a produção de diversos fatores de virulência, que permite que o fungo resista a mudanças ambientais, através de sinalizações para iniciar seu crescimento e resistência, e são de importante entendimento para o controle e tratamento da infecção (MOMIN; WEBB, 2021). Esses fatores de virulência em *C. neoformans* incluem: alterações na superfície celular e alterações no tamanho da célula (ALTAMIRANO; JACKSON; NIELSEN, 2020).

Fazem parte das alterações na superfície celular: modificações na composição da parede celular, produção de uma cápsula de polissacarídeo e síntese de melanina.

A parede celular passa por remodelagem em resposta ao ambiente-hospedeiro, originalmente compõe-se principalmente de α - glucano, β - glucano, quitina e quitosana, em resposta ao hospedeiro a quantidade de β - glucano na parede celular diminui, ao passo que a quitina aumenta (BAKER; SPECHT; LODGE, 2011; MUKAREMERA *et al.*, 2018).

Cryptococcus neoformans produz uma cápsula de polissacarídeo ancorada à superfície externa da parede celular e é composta principalmente por glucuronoxilimanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) (CHERNIAK; REISS; TURNER, 1982, CHERNIAK; JONES; REISS, 1988). Essa cápsula é desenvolvida permitindo que a fagocitose não ocorra, de forma que limita a resposta imune que sinaliza a produção de anticorpos e as proteínas complementares (CASADEVALL *et al.*, 2019). A indução da cápsula pode ser dependente do pH, onde seu crescimento é maior em ambientes alcalinos e pode ser também dependente da temperatura, concentração de CO₂ e aquisição de ferro (MOMIN; WEBB, 2021).

Outra característica é o acúmulo de melanina, que é um pigmento escuro encontrado em animais e fungos (ZARAGOZA, 2019). Ela é depositada na parede celular e desempenha um papel protetor durante a infecção, confere resistência a vários fatores de estresse, como por exemplo, os radicais livres gerados pela resposta imune, temperatura e metais pesados, além do mais, ajuda a diminuir a permeabilidade da parede celular (NOSANCHUCK, *et al.*, 2000).

Ademais, *Cryptococcus neoformans* sofre variação em seu tamanho celular. Esse fungo apresenta normalmente 5-7 μ m de diâmetro, quando cultivado *in vitro*. Em modelos utilizando camundongos, mas também em células humanas, ou seja, *in vivo*, mostraram que as células variam de tamanho, de menores que 1 μ m a até 100 μ m (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA, *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014), e essas células com o diâmetro superior a 10 μ m são referidas como células titãs (OKAGAKI *et al.*, 2010). O tamanho das células varia de acordo com o local da infecção e são importantes para o seu sucesso, por exemplo, células menores podem promover a sobrevivência dentro dos macrófagos, enquanto células maiores podem ajudar na sobrevivência do patógeno durante a infecção pulmonar (ALTAMIRANO; JACKSON; NIELSEN, 2020).

2.5 Antifúngicos utilizados no tratamento da Criptococose

O tratamento padrão é o uso do antifúngico anfotericina B (um polieno de seis

décadas) o qual apresenta alta nefrotoxicidade requerendo administração intravenosa e possui alto custo (MICALLEF *et al.*, 2015). A anfotericina B, flucitosina, fluconazol e itraconazol não são utilizados apenas no tratamento da meningite criptocócica, mas em várias outras infecções fúngicas com risco de vida (HAMILL, 2013; KNEALE *et al.*, 2016). A escolha de esquemas terapêuticos, dose e tempo de tratamento dependem do grau de imunossupressão, forma clínica da criptococose e disponibilidade de medicamentos antifúngicos (Organização Mundial da Saúde, 2018). Um fator preocupante é a dificuldade no acesso das populações a esses antifúngicos.

O voriconazol pertence a segunda geração de triazóis, é um derivado sintético de fluconazol com atividade fungicida contra *Cryptococcus* (SABATELLI *et al.*, 2006; PATTERSON *et al.* 2016). Todavia, ainda não é recomendado pelas diretrizes de tratamento da criptococose (PERFECT *et al.*, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018), mesmo que tenha demonstrado sucesso na atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp. *in vitro* e *in vivo* (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2004; CALVO *et al.*, 2010; REICHERT-LIMA *et al.*, 2016).

Segundo Kneale *et al.* (2016), a anfotericina B não está licenciada em 22 países e não está disponível em 42 países, ou seja, cerca de 481 milhões de pessoas (6,6% da população mundial) não têm acesso ao medicamento. Por outro lado, segundo mesma pesquisa o fluconazol é disponível em quase todos os países que os autores receberam dados (141 países), sendo que dois aparentam ser totalmente dependentes do Programa de Parceria Diflucan, restrito ao tratamento de infecções oportunistas em pessoas portadoras de HIV/aids.

Já o antifúngico itraconazol, não está disponível para pelo menos 78 milhões de pessoas, e ao contrário dos outros antifúngicos, ele não é listado pela OMS como medicamento essencial. Ademais, a flucitosina não está licenciada em 89 países e não está disponível em 94 países, isto é, 2898 milhões de pessoas (40% da população mundial, não possuem acesso ao medicamento para meningite criptocócica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar *Cryptococcus* spp. de excrementos de pombos (*Columba livia*) presentes em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência de *Cryptococcus* spp. em 27 Unidades Básicas de Saúde;
- Identificar os tipos moleculares de *Cryptococcus* isolados;
- Determinar a susceptibilidade *in vitro* de *Cryptococcus* spp. frente aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de pesquisa

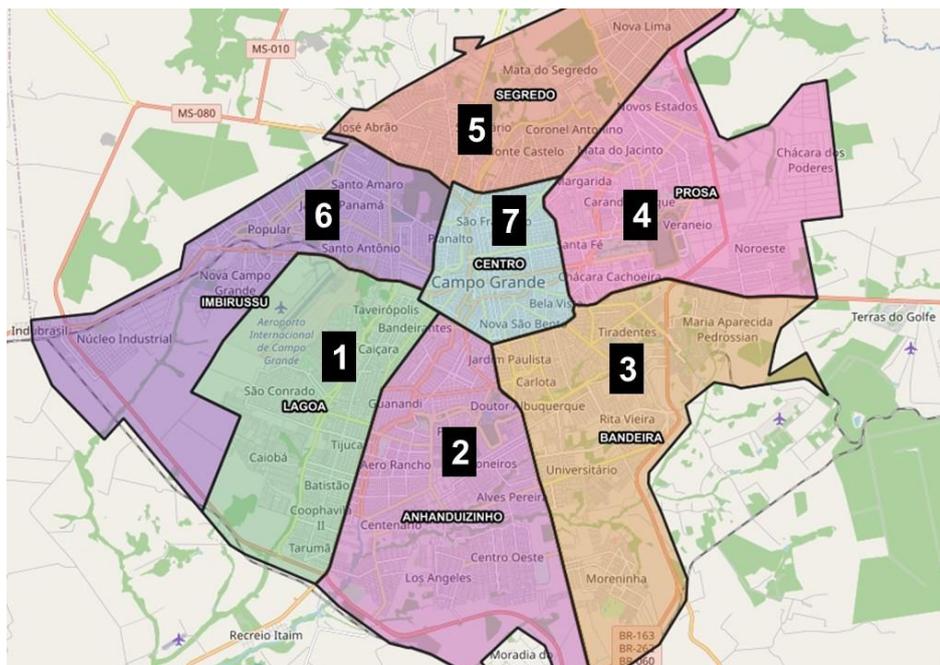
Esse estudo é de natureza descritiva analítica de desenho transversal.

4.2 Locais de pesquisa

O estado de Mato Grosso do Sul (MS) está localizado na região do Centro-Oeste do Brasil e ocupa uma área de 357.147,995 km². Latitude: 7° 36' 0" Sul, Longitude: 37°48' 0" Oeste. O estado apresenta três tipos de biomas: Pantanal, Mata Atlântica e Cerrado, sendo o último o mais predominante. O clima é tropical semi-úmido, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos (NIMER, 1989).

Este estudo foi realizado na cidade de Campo Grande-MS que possui cerca de 916.001 habitantes (IBGE, 2021). Geograficamente, o município está situado próximo da fronteira do Brasil com Paraguai e Bolívia. Localiza-se na latitude de 20°26'34" Sul e longitude de 54° 38' 47" Oeste. O município de Campo Grande é dividido em sete macrorregiões (figura 1): Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa e Segredo.

Figura 1 – Mapa ilustrando sete macrorregiões do município de Campo Grande – MS

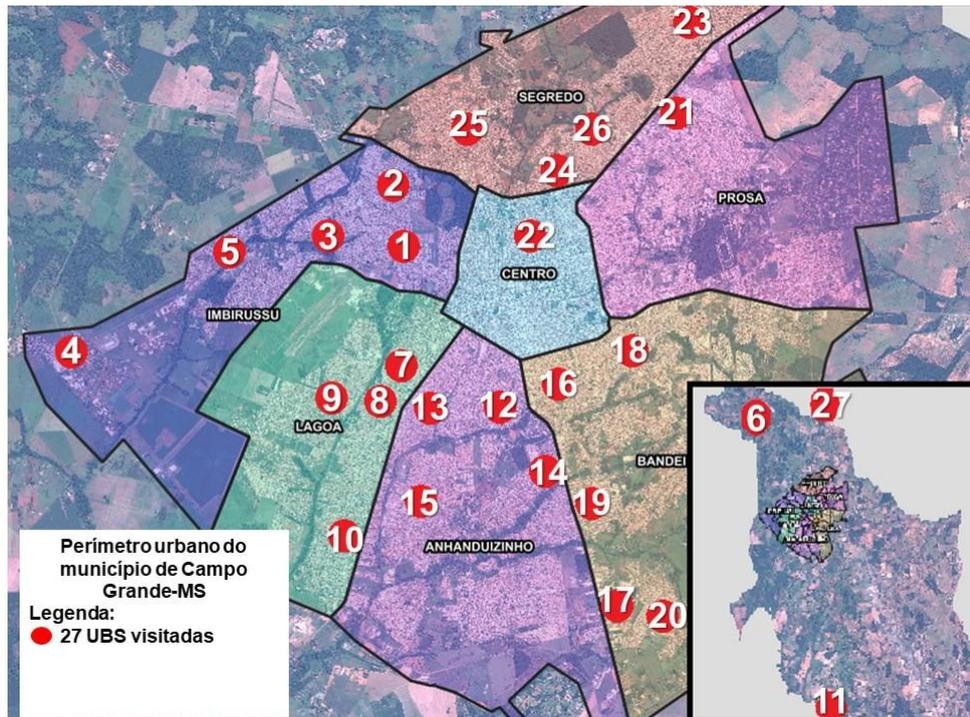


Fonte: Adaptado de SISGRAN (2022).

As amostras de excrementos de pombos (*Columba livia*) foram coletadas em

27 Unidades Básicas de Saúde que se encontram na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. A figura 2 mostra a localização dessas unidades, com destaque para três unidades que estão localizadas em locais mais afastados do município.

Figura 2 - Distribuição espacial das 27 Unidades Básicas de Saúde (UBS) de onde foram coletadas as amostras de excrementos de pombos. Campo Grande – MS



Círculos vermelhos: pontos de coleta
Fonte: Adaptado de SISGRAN (2022).

4.3 Período de pesquisa

O isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras de excrementos de pombos foi realizado em dois períodos: de outubro a dezembro de 2018 e de fevereiro de 2021 a fevereiro de 2022.

4.4 Procedimentos de coleta das amostras

Critérios de inclusão: excrementos de pombos apresentando aspecto seco; depositado nas superfícies de ambientes externos; presença de pombos próximos aos excrementos e quantidade superior a um grama.

Critérios de exclusão: excretas úmidas e excretas de outras aves próximas as excretas de pombos.

De cada UBS foram coletadas pelo menos 10 amostras provenientes de áreas

externas. As UBS que não apresentavam excrementos de pombos, foram classificadas como “sem excrementos”.

A coleta foi realizada de acordo com o protocolo de coleta de amostras ambientais do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da FIOCRUZ (LAZÉRA *et al.*, 1996). As amostras foram coletadas com espátulas previamente esterilizadas para raspagem do material (figura 3) e armazenadas em frascos tipo coletor universal estéril, sendo devidamente identificadas por ponto de coleta. Logo após, foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da FACFAN - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e acondicionadas sob refrigeração entre 8 e 12°C até serem processadas.

Figura 3 – A. Fotos ilustrando procedimento de coleta de excrementos de pombos. B e C. Alguns locais de coleta.



Fonte: Silva (2022)

4.5 Processamento das amostras

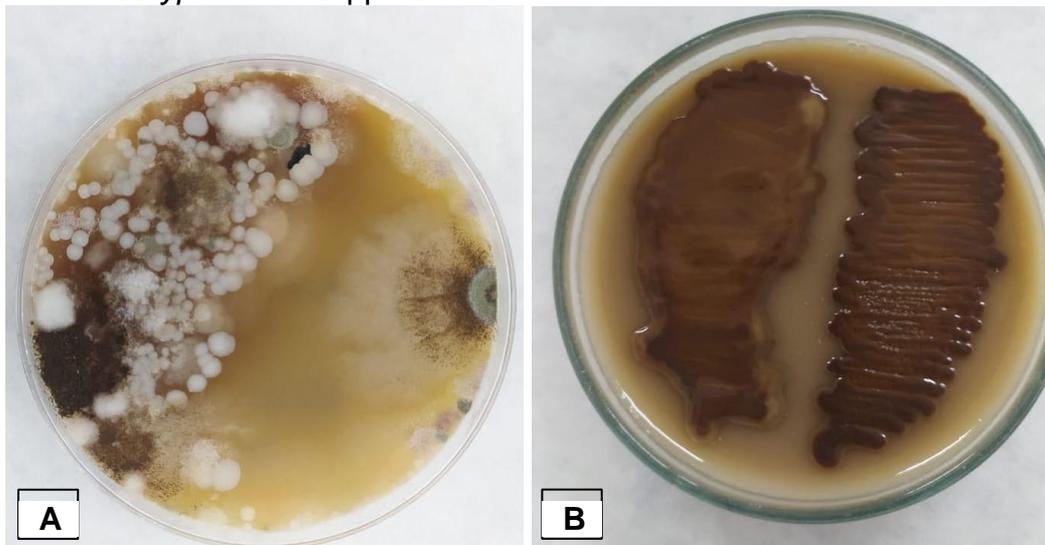
As análises laboratoriais da pesquisa foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas e no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O material foi processado em cabine de segurança biológica classe II-B2. Resumidamente, foi macerado 1g de excremento com a adição de 50 mL de salina 0,9% estéril acrescida de cloranfenicol (400 mg/L) utilizando-se gral e pistilo estéreis. O material macerado foi colocado em *erlenmeyer*, homogeneizado em vórtex por 3 minutos e decantado por 30 minutos à temperatura ambiente.

4.6 Cultivo de amostras e identificação fenotípica

De cada amostra foi aspirado 100µL do sobrenadante e semeado em placas de Petri contendo meio ágar semente de níger (ASN), com 0,2mg/l de cloranfenicol. Foram semeadas uma placa para cada amostra, depois incubadas em estufa por até 5 dias à temperatura de 35°C. O crescimento foi observado todos os dias, e na presença de colônias de pigmentação bege ou marrom sugestivas de levedura foram repicadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose – ASD (Neogen®, USA), até a obtenção de colônias puras. Em seguida, foram analisadas a micromorfologia dessas colônias em microscópio e repicadas para placas de ASD e tubos com água estéril, para manutenção e estoque das colônias. A figura 4 mostra colônias de diferentes espécies de fungos antes (A) e após o isolamento de colônias sugestivas de *Cryptococcus* spp. (B).

Figura 4 - A - Colônias de diferentes espécies de fungos da primeira semeadura em ágar semente de Níger. B - Obtenção de colônias puras de *Cryptococcus* spp.



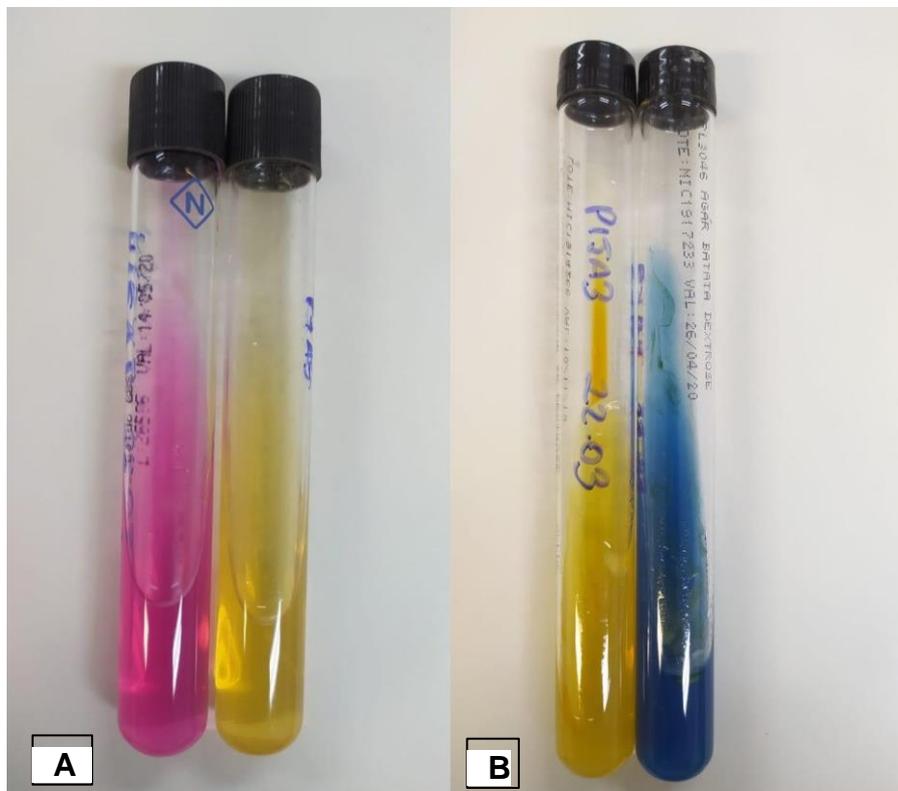
Fonte: Silva (2022)

As colônias de cor marrom e aspecto mucóide, características de *Cryptococcus* spp. foram semeadas em tubos contendo ureia agar base-Christensen (HIMEDIA, Índia) para a detecção da enzima urease. Quando o microrganismo degrada a ureia ocorre a alcalinização do meio, e o resultado é a alteração da cor do meio de amarelo palha para cor de rosa pink (figura 5). Os isolados foram incubados à 35°C por até 6 dias.

Para diferenciação de leveduras dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* colônias puras foram semeadas em meio canavanina-glicina-azul de bromotimol -

CGB e incubadas até 5 dias à 35°C (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNET, 1982). Espécies pertencentes ao complexo *C. gattii* utilizam a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, e são resistentes à L- canavanina, alterando a cor do meio original verde, para azul cobalto (figura 5B). Por outro lado, as espécies do complexo *C. neoformans* são inibidas pela L- canavanina e mantêm a cor verde original.

Figura 5 - A- Teste da urease, ilustrando o resultado positivo (rosa) e negativo (amarelo). B- Teste de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), ilustrando a diferença entre os complexos *C. neoformans* (verde) e *C. gattii* (azul cobalto)



Fonte: Silva (2022).

4.7 Tipagem molecular

4.7.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com Ferrer *et al.* (2001), conforme adaptação feita por PASA (2011). Culturas de *Cryptococcus* com 72h de crescimento em ASD foram transferidas para microtubo estéril e armazenadas a -20°C *overnight*. No dia seguinte, adicionou-se 500µL do tampão de lise e 5µL de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) nos microtubos e agitou-se em vortex. Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C por 1 h sob agitação. O lisado foi extraído com 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, EUA). Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos, ± 400 µL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo (1,5mL) estéril, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol (Synth, Brasil) para obtenção do DNA precipitado a -20°C *overnight*.

O precipitado foi centrifugado a 4°C a 14000 rpm por 15 minutos e após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 500µL de etanol a 70% por 3 vezes.

Logo após, realizou-se a secagem em estufa a 50°C (± 1 hora) e o DNA precipitado foi ressuscitado com a adição de 100µL de água ultrapura estéril, aquecido em banho-maria a 65°C por 15 min e armazenado a -20°C.

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA) apresentando concentração média de 2.694,4 ng/µL.

4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR e Reação de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

A reação de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) do gene *URA5* foi realizada de acordo com Meyer *et al.* (2003) com adaptações feitas por PASA (2011). Os primers *URA5* (Invitrogen, EUA) (5' ATGCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e *SJ01* (Invitrogen, EUA) (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') foram utilizados para a amplificação. Para realização da PCR preparou-se um *mix*, em que cada reação continha 8,4 µL de água ultrapura, 2,5µL tampão 10x PCR, 1,5µL cloreto de magnésio 25mM, 2,5µL de DNTPs 2mM, 2,5µL do primer *URA5* e *SJ01* 10ng/µL, 0,1µL de Taq DNA polimerase

(Invitrogen, EUA) 5U/ μ L e 5 μ L de DNA. Para a realização da PCR foi utilizado o termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA). A figura 6 apresenta as condições das reações de PCR.

Figura 6 - Parâmetros utilizados na programação do termociclador na reação de PCR para amplificação do gene *URA5* (\cong 750 pb)

Reação de PCR <i>URA5</i>			
Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	45 s	
Anelamento	55,7	1 min	35
Extensão	72	2 min	
Extensão final	72	10 min	1
Refrigeração	4	X	

A eletroforese do produto da PCR foi feita em gel de agarose (Sigma-Aldrich, EUA) a 1,4% com tampão de corrida Tris-borato- EDTA (TBE) 1X utilizando fonte de 100V, 400mA e 90W durante 1h e 20 minutos. O gel foi corado com GelRed (Invitrogen, USA) e as bandas do gene *URA5* (\cong 750 pb) visualizadas em transiluminador de luz ultra violeta. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 1kb no gel de agarose.

Na reação de RFLP, foram utilizadas as enzimas de restrição: *Sau96I* (5.000U/mL; New England Biolabs, EUA) e *HhaI* (20.000U/mL; Sinapse Biotecnologia, Lituânia). O master mix com volume de 2,5 μ L de era composto de 1,5 μ L de NeBH, 0,15 μ L de BSA, 0,2 μ L de *HhaI*, 0,35 μ L de *Sau96I*, 0,3 μ L de H₂O ultra-pura estéril e 17 μ L do produto de PCR. A reação ocorreu sob incubação a 37°C durante 3 horas em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA),

Uma nova eletroforese foi realizada em gel de agarose (Sigma-Aldrich, EUA) 2,0% com tampão de corrida TBE 1X à 100V, 400mA e 90W durante 3 h. O gel foi corado com GelRed (Invitrogen, USA) e visualizado em luz UV. A análise das bandas obtidas foi realizada mediante a comparação visual das bandas dos padrões

moleculares com as bandas das amostras, classificando o genótipo dos *Cryptococcus* spp isolados. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotecnologia, Argentina).

4.8 Teste de susceptibilidade a antifúngicos

O teste de susceptibilidade de leveduras *in vitro* foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento EUCAST versão 7.3.2, por meio da microdiluição em caldo (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2020). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizados quatro antifúngicos: anfotericina B (AMB) (SIGMA-ALDRICH, Israel), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITC) e voriconazol (VRC) (SIGMA-ALDRICH, USA).

Em todos os testes de susceptibilidade foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, EUA), com L- glutamina, sem bicarbonato, suplementado com 2% de glicose e tamponado com MOPS a 0,165 M (ácido morfolinopropanosulfônico) (SIGMA-ALDRICH, EUA).

4.8.1 Preparo de soluções estoque

Os antifúngicos foram pesados e dissolvidos de acordo com as instruções do EUCAST. Posteriormente, armazenados em criotubos de 2 mL e estocados a -20°C. Todas as soluções estoques foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) como recomendado pelo EUCAST e instruções do fabricante Sigma-Aldrich.

4.8.2 Preparação das placas de microdiluição

Foram utilizadas microplacas de fundo chato com 96 poços e em cada placa foram diluídos os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Nos poços das colunas de 1 a 10 foram dispensados 100 µL do agente antifúngico diluído com a concentração correspondente e 100 µL das suspensões dos inóculos. Os poços das colunas 11 e 12 foram utilizados para o controle de crescimento (+) e controle de esterilidade (-), respectivamente. Os poços da coluna 11 foram preenchidos com 100 µL de RPMI 2% G e 100 µL da suspensão do inóculo, enquanto a coluna 12 com 100 µL de água estéril do lote usado para o preparo do inóculo e 100 µL de meio RPMI 2% G. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

As placas de susceptibilidade antifúngica foram preparadas com uma faixa

de concentrações de ITC de 0,008 - 4 mg/L, VRC de 0,008 - 4 mg/L, FLZ de 0,125 - 64 mg/L e AMB de 0,008 - 4 mg/L.

4.8.3 Preparação do inóculo

Os isolados foram cultivados à 35°C em meio ágar Sabouraud dextrose por 48h antes do teste. Em seguida, com auxílio de alça bacteriológica foi raspado em torno de cinco colônias distintas e adicionadas em tuboscontendo 5 mL de água estéril. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a densidade celular ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A suspensão final obtida foi de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida, foram distribuídos 100 µL da suspensão da maior para a menor diluição do antifúngico até o controle de crescimento, para verificar a viabilidade do microrganismo.

Os testes foram validados com a utilização de cepas padrão de *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) para o controle de qualidade, com crescimento de 24h, as quais foram ajustadas a densidade celular em água destilada na escala 0,5 de McFarland e distribuídas nos poços das colunas 1-10, nas linhas G e H.

4.8.4 Leitura das placas de microdiluição

As placas foram incubadas a 35°C e depois de 24h foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM) das cepas ATCC, e depois de 48h a leitura da CIM foi realizada visualmente mediante a comparação do crescimento fúngico em cada orifício com o da coluna do controle de crescimento.

Em relação à anfotericina B, a CIM foi considerada como a menor concentração do fármaco que inibiu 90% do crescimento da levedura, enquanto para os azóis foi considerada a menor concentração do antifúngico que reduziu em 50% o crescimento do fungo.

A interpretação dos resultados para anfotericina B foi baseada nos pontos de corte clínicos (*clinical breakpoints*) estabelecidos pelo EUCAST (E.def 7.3, E. Def 9.4 e E. Def 11.0 versão 3.0). Devido à ausência de pontos de corte para os azóis em relação aos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, foram utilizados valores de corte epidemiológicos (*ECOFFs*) propostos anteriormente (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2012). Os valores de CIM utilizados na interpretação dos resultados do teste de

susceptibilidade antifúngica estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima utilizados na interpretação dos resultados do teste de susceptibilidade antifúngica

Antifúngico	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)		
	<i>ECOFF</i> (mg/L)>95%	Pontos de corte clínicos	
	Não Selvagem >	Sensível ≤	Resistente >
Anfotericina B	1	1	1
Fluconazol	8	-	-
Itraconazol	0,5	-	-
Voriconazol	0,25	-	-

5. Considerações éticas

Esse estudo teve autorização legal da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (12/2020).

6 RESULTADOS

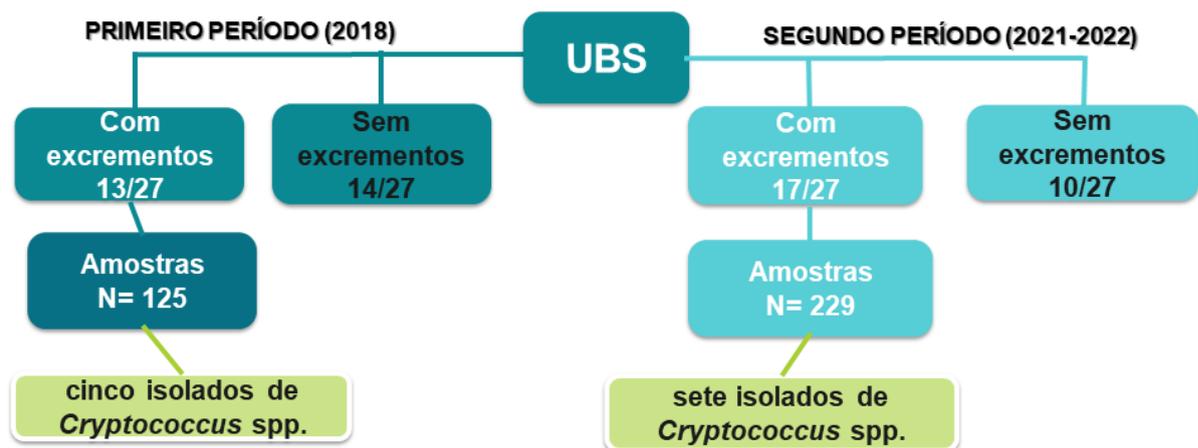
A figura 7 mostra o número de amostras de excrementos de pombos coletadas e a frequência de *Cryptococcus* spp. isolados em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS.

No primeiro período de estudo realizado em 2018, 51,85% (14/27) das UBS não apresentaram excrementos de pombos (*Columba livia*), enquanto 48,15% (13/27) apresentaram. Nessas UBS foram coletadas 125 amostras. Um total de cinco *Cryptococcus* spp. foram isolados de duas UBS.

No segundo período de estudo (2021 - 2022), foram realizadas visitas nas mesmas 27 Unidades Básicas de Saúde. Em 63% (17/27) das UBS foram observados excrementos de pombos e realizada a coleta de amostras. Durante este período foram coletadas 229 amostras. Um total de sete *Cryptococcus* spp. foram isolados de cinco UBS.

As unidades de saúde com amostras positivas no primeiro período diferem das unidades de saúde do segundo período.

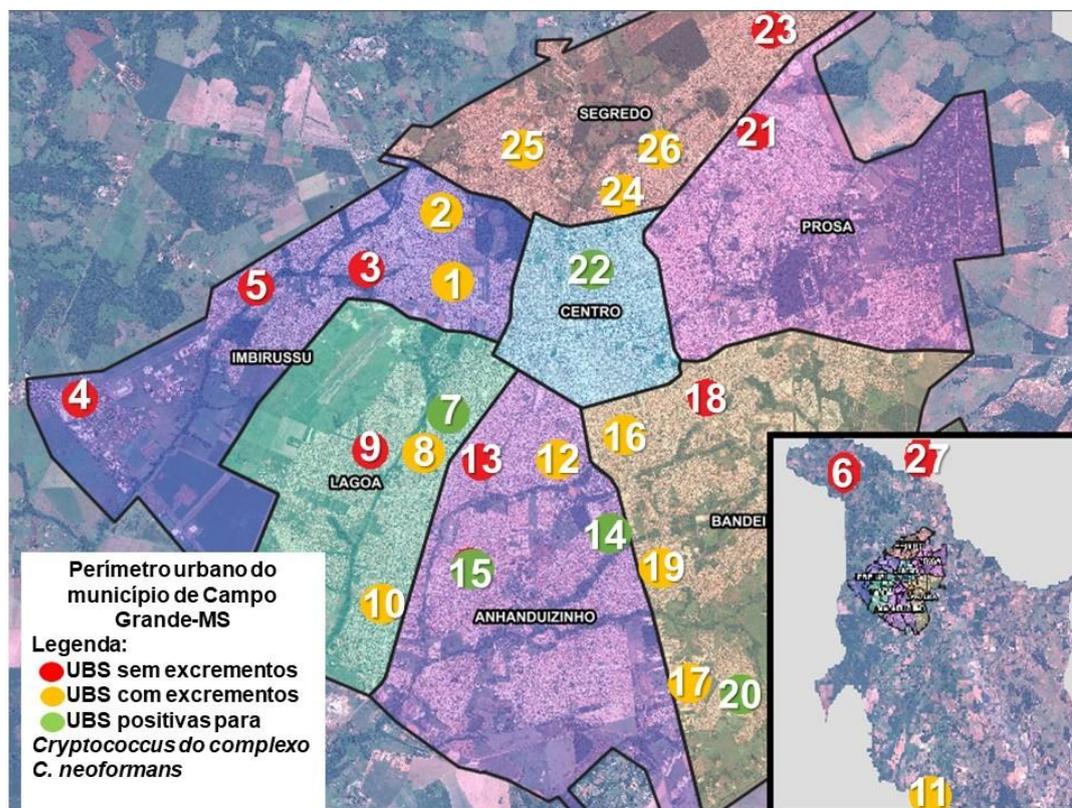
Figura 7 - Fluxograma ilustrando o número de amostras coletadas e a frequência de *Cryptococcus* spp. isolados de excrementos de pombos em dois períodos de estudo (outubro a dezembro 2018/ fevereiro de 2021 a fevereiro 2022), em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS



As macrorregiões em que tiveram isolamento de *Cryptococcus* spp. em 2018 foram: região Segredo (n=1) e a região Imbirussu (n=4) e em 2021/2022

Anhanduizinho (n=3), Lagoa (n=1), Centro (n=1) e Bandeira (n=2). A figura 8 ilustra as macrorregiões de Campo Grande-MS com destaque para as UBS (círculo verde) nas quais foram isoladas *Cryptococcus* spp. em excrementos de pombos.

Figura 8 - Distribuição espacial das macrorregiões de Campo Grande-MS ilustrando Unidades Básicas de Saúde com amostras (excrementos de pombos) positivas para *Cryptococcus* spp.



Entre os 12 isolados com teste de fenoxidase positivo em ágar Níger, oito foram CGB negativo e quatro CGB positivo (figura 9).

A tipagem molecular por PCR-RFLP revelou que os 12 isolados pertenciam ao complexo *Cryptococcus neoformans*, tipo molecular VNI, como mostra a figura 10.

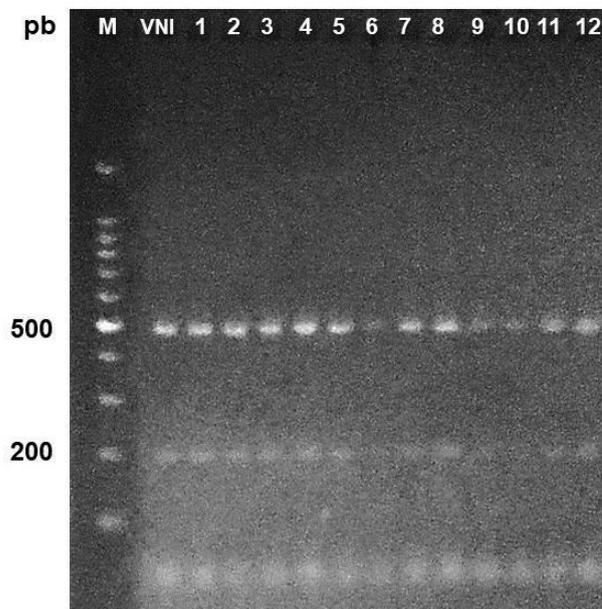
Figura 9 - Resultados da identificação fenotípica no meio CGB e molecular por PCR-RFLP (*URA5*)

AMOSTRAS	CGB	PCR-RFLP (<i>URA5</i>)
C2	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
C9	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
C10	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
C11	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
M4	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
M5	Cg	<i>C. neoformans</i>/VNI
Vn2	Cg	<i>C. neoformans</i>/VNI
Vn3	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
Vn7	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI
Vn10	Cg	<i>C. neoformans</i>/VNI
AR4	Cg	<i>C. neoformans</i>/VNI
Sil2	Cn	<i>C. neoformans</i> /VNI

Cn= *C. neoformans*; Cg= *C. gattii*.

Amostras em negrito indicam discordâncias na identificação entre os testes utilizados

Figura 10 - Perfil representativo de RFLP-*URA5* de *Cryptococcus neoformans* após a digestão das enzimas de restrição *HhaI* e *Sau96I*



Legenda: **M**: marcador de peso molecular (100 pb); **VNI**: padrão molecular; amostras de **1-12**: *Cryptococcus neoformans* VNI.

De acordo com os testes de susceptibilidade realizados, a concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B variou de 0,25 mg/L a 1 mg//L, portanto,

nenhum isolado apresentou resistência a este poliênico, segundo os critérios do EUCAST.

As CIM variaram de 0,5 mg/L a 4 mg/L para fluconazol, 0,008 mg/L a 0,25 mg/L para itraconazol e, de 0,015 mg/L a 0,125 mg/L para voriconazol. Todas os isolados foram considerados tipo selvagem (*Wild Type - WT*), ou seja, com ausência de resistência. Os resultados das CIM obtidas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de quatro agentes antifúngicos frente a *C. neoformans* VNI obtidos de excrementos de pombos em Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS - outubro/dezembro 2018 e fevereiro 2021-2022 (n=12)

Região	Amostra	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)			
		AMB	FLC	ITC	VRC
Anhanduizinho	C2	0,5	2	0,25	0,062
Anhanduizinho	C9	0,25	1	0,062	0,031
Lagoa	C10	1	2	0,125	0,062
Centro	C11	1	1	0,125	0,031
Bandeira	M4	1	0,5	0,031	0,031
Bandeira	M5	0,5	1	0,062	0,031
Segredo	Vn2	0,5	1	0,031	0,031
Segredo	Vn3	1	4	0,125	0,125
Segredo	Vn7	1	4	0,125	0,125
Segredo	Vn10	1	0,5	0,031	0,031
Anhanduizinho	AR4	1	1	0,125	0,031
Imbirussu	Sil2	0,5	0,5	0,008	0,015

AMB: Anfotericina B; FLZ: Fluconazol; ITC: Itraconazol; VRC: Voriconazol

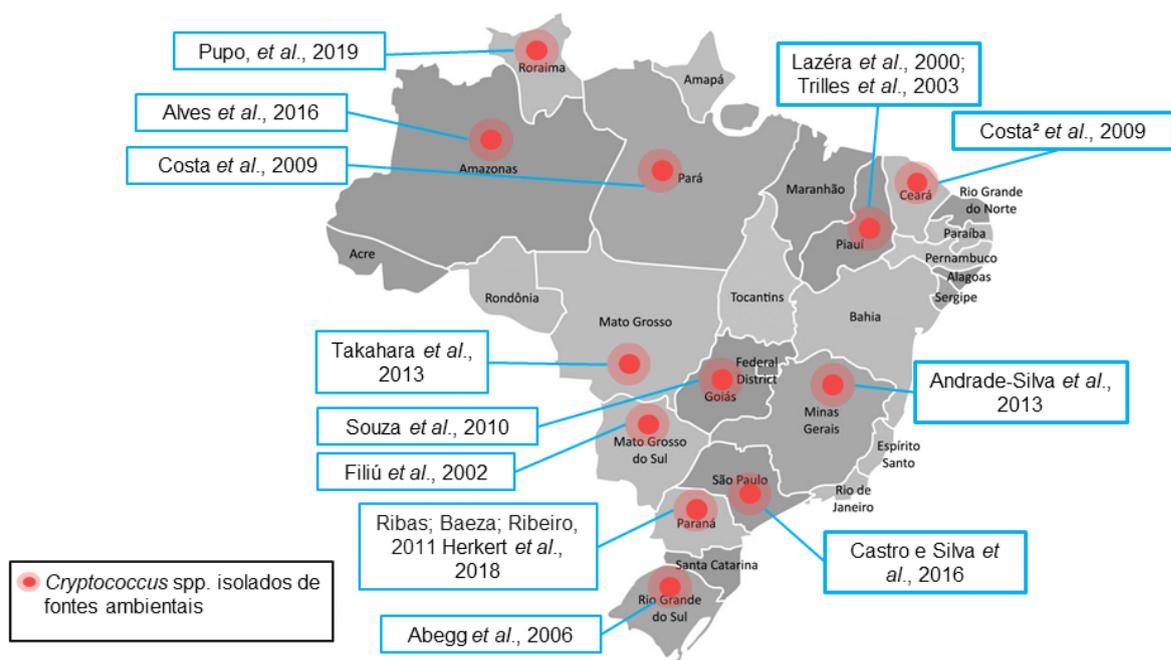
7 DISCUSSÃO

O conhecimento de fontes ambientais de *Cryptococcus* spp. é fundamental para tomadas de medidas de controle de pombos e reduzir o número de casos de criptococose na população, em especial indivíduos susceptíveis que buscam atendimento em unidades de saúde pública.

Com este estudo, documenta-se pela primeira vez na região Centro Oeste do Brasil, o isolamento de *Cryptococcus* do complexo *C. neoformans* em excrementos de pombos encontrados em Unidades Básicas de Saúde (7/27; 26%).

O isolamento de *Cryptococcus* spp. oriundos de fontes ambientais já foi descrito em algumas regiões brasileiras conforme ilustrado na figura 11 (LAZÉRA *et al.*, 2000; FILIÚ *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009a; COSTA *et al.*, 2009b; SOUZA *et al.*, 2010; RIBAS; BAEZA; RIBEIRO, 2011; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013; CASTRO E SILVA, *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016; TAKAHARA *et al.* 2013; HERKERT *et al.*, 2018; PUPO *et al.*, 2019). Em pesquisa realizada em biblioteca eletrônica científica (PubMed) utilizando os termos "*Cryptococcus*, health, care, basic units, pigeon e environment", não foi encontrada nenhuma publicação entre 2011-2021 no Brasil.

Figura 11 - Distribuição de *Cryptococcus* spp. isolados de fontes ambientais no Brasil



Fonte: Silva (2022).

Estudo realizado em área metropolitana de Cuiabá, estado de Mato Grosso, investigou e identificou *C. neoformans* provenientes de excrementos de pombos de diferentes locais públicos e residenciais (TAKAHARA *et al.* 2013). Apesar de terem sido observados excrementos de pombos em oito unidades de saúde da região, nenhum *Cryptococcus* spp. foi isolado.

Na presente investigação, 3,39% (12/354) das amostras de excrementos de pombos de Unidades Básicas de Saúde foram positivas para *Cryptococcus neoformans*. Outros estudos nas regiões brasileiras também tiveram isolados de *Cryptococcus* oriundos de excrementos de pombos de unidades de saúde e suas proximidades (KOBAYASHI *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; TEODORO *et al.*, 2013).

No estudo de Teodoro *et al.*, (2013) 36, 78% das amostras ambientais de hospitais/proximidades foram positivas para *Cryptococcus* spp.. De 13 amostras ambientais de unidades de saúde, quatro foram positivas para *C. neoformans* na pesquisa de Soares *et al.* (2005). Na investigação de Kobayashi *et al.*, (2005), em 26 amostras de excrementos de *C. livia* de áreas externas de hospitais, quatro foram positivas para *C. neoformans* var. *grubii*.

As Unidades Básicas de Saúde do município de Campo Grande prestam diversos tipos de atendimento, entre esses: consultas de rotinas e de prevenção, pequenas urgências, diagnóstico e tratamento de doenças agudas e crônicas. Nestas unidades também é realizado diagnóstico e tratamento de doenças transmissíveis como tuberculose, hepatites, infecções sexualmente transmissíveis (sífilis, HIV/aids), entre outras. Diante deste cenário, a identificação de *C. neoformans* em áreas externas das UBS é de grande importância, pois nestas unidades, diariamente, há grande circulação de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, que estão expostos à inalação de propágulos infectantes e são considerados grupos de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas como a criptococose.

Embora *C. neoformans* esteja mais associado a criptococose em indivíduos imunocomprometidos, este fungo também causa infecção em pacientes sem comorbidades diagnosticadas (REVENGA, *et al.*, 2002; HAYASHIDA, *et al.*, 2017). Maranhão e colaboradores (2020) relataram um caso de criptococose em um morador da região urbana, com ausência de comorbidades e sintomas atípicos, no qual *C. neoformans* genótipo VNI foi confirmado através de testes moleculares. Um fator relevante que corrobora com o cenário do presente estudo, é que o paciente

trabalhava em região com muitos pombos e seus excrementos. Nessa situação de pacientes sem condições predisponentes evidentes para criptococose, o diagnóstico acaba sendo desafiador e com atraso devido à falta de suspeita clínica (PAPPAS, 2013).

Alguns estudos retrospectivos sobre a criptococose em grupos de pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) negativo/não transplantado, revelam que este grupo pode apresentar maior atraso no diagnóstico e maior duração dos sintomas do que observado em pacientes HIV-positivos (BRATTON, *et al.*, 2012; LOMES, *et al.*, 2016; MOTOA, *et al.*, 2020). Fatores como idade avançada, comorbidades graves e inexperiência clínica são propostos como contribuintes para o atraso no diagnóstico e tratamento da criptococose em pacientes HIV negativos (GEORGE *et al.*, 2018), o que conseqüentemente contribui para uma maior taxa de mortalidade (BRATTON *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2012; BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013).

No primeiro e segundo períodos de estudo, cerca de 48% e 63%, respectivamente, das unidades visitadas continham excretas de pombos. Acredita-se que os fatores associados à proliferação dos pombos se deva à arquitetura das unidades de saúde, com vigas e nichos que permitem a nidificação dessas aves. Nas unidades de saúde com estruturas que impedem o pouso ou entrada dos pombos, percebeu-se que a presença desses animais era quase nula.

Os excrementos de pombos fornecem ambiente alcalino, creatina e é rico em compostos nitrogenados que favorecem a sobrevivência e reprodução de *Cryptococcus* spp. (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). Filiú e colaboradores (2002) detectaram até 46.000 propágulos viáveis de *C. neoformans* var. *neoformans* por grama de excremento seco de pombos, indicando a existência de fontes ambientais microfocais. Isso torna-se um perigo para a saúde pública, e mais especificamente, para as pessoas dedicadas ao cuidado e limpeza das unidades de saúde, pois os locais com grande quantidade de excrementos e circulação de pessoas transformam-se em reservatórios de disseminação da criptococose.

A primeira descrição de ocorrência saprofítica de *C. neoformans* na cidade de Campo Grande foi feita por Filiú *et al.*, (2002). Neste estudo, 50% das amostras de excretas de aves analisadas foram positivas. Mais recentemente, Corrêa-Junior (2019) documentou a presença de *Cryptococcus neoformans* (n=10), tipo molecular VNI, em amostras de excrementos de *Columba livia* em 3/92 escolas municipais de

Campo Grande-MS.

Neste estudo, apesar do período (3 meses X 1 ano) e o número de coleta de amostras ter sido maior no segundo período, a porcentagem de amostras positivas encontrada no segundo período (3,6%) foi menor do que a encontrada no primeiro período (4,0%). Este fato pode ser devido a um relatório dos resultados obtidos no primeiro período de estudo enviado à Prefeitura Municipal, a partir do qual medidas de controle foram tomadas. Vale destacar que o nosso grupo obteve todo apoio dos gestores municipais e dos responsáveis pelas unidades de saúde durante o desenvolvimento deste estudo.

Outro fato que pode ter contribuído para o reduzido número de pombos e, conseqüentemente, menor número de amostras positivas no segundo período de coletas de amostras, foi a divulgação da pesquisa realizada por Corrêa-Junior (2019) que documentou a presença de *Cryptococcus* em escolas municipais em Campo Grande - MS. Os resultados do estudo de Corrêa-Junior forneceram subsídios para a publicação de uma lei municipal (Lei Complementar Nº 345 de 18/01/2019) que alterou o Código Sanitário do município de Campo Grande-MS, que passou a considerar os pombos como pragas urbanas que precisam ser controladas.

No presente trabalho, 33,33% (4/12) dos resultados do teste de CGB foram discordantes dos obtidos com a técnica de PCR-RFLP. O ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) foi formulado como uma ferramenta de diagnóstico de etapa única para distinguir entre as espécies de *Cryptococcus* do complexo *C. neoformans* e do complexo *C. gattii* (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

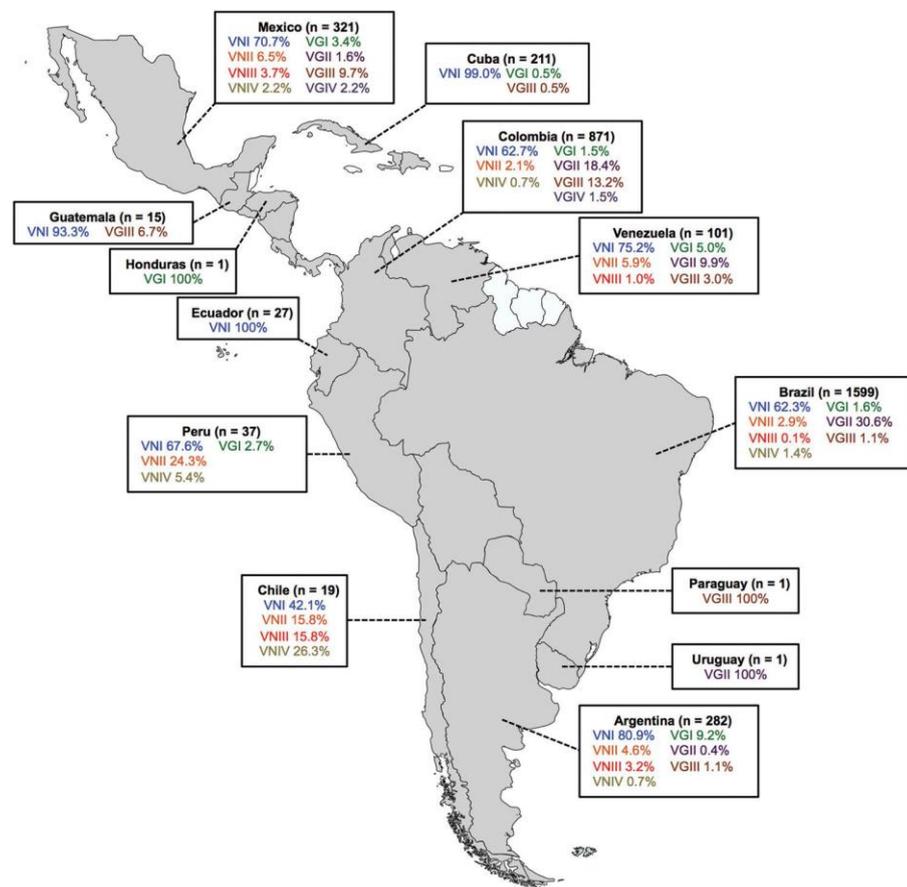
Alguns estudos relatam reações positivas para CGB em isolados de *Cryptococcus neoformans*, identificando resistência à canavanina (KHAN, *et al.*, 2003; LEAL, *et al.*, 2008; NAKAMURA, *et al.*, 2009). Acredita-se que o resultado encontrado provavelmente deve-se a uma reação falso-positiva para CGB, como relatado nos estudos ou pela presença de espécies do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* em uma mesma placa, acreditando que as colônias não estavam puras. Por isso, a importância de realizar métodos complementares para confirmar os resultados de CGB e evitar equívocos de diagnóstico.

Os agentes da criptococose são mais mais frequentemente isolados de excretas secas (antigas) e não expostas à luz solar direta (ZARRIN *et al.*, 2010; ISLAM *et al.*, 2020). Sob este aspecto, o número reduzido de amostras positivas neste estudo provavelmente está associado a rotina de limpeza frequente das áreas

externas das unidades de saúde, e também relacionado aos locais de coleta sem cobertura, resultando na exposição solar demasiada das excretas de pombos.

Este estudo corrobora com dados da literatura que descreve *C. neoformans* - VNI como o tipo molecular mais prevalente isolado de amostras ambientais (MEYER *et al.*, 2003; CASALI *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2011; CORRÊA-JUNIOR 2019; PUPO *et al.*, 2020). Este tipo molecular também é o mais descrito em amostras clínicas e veterinárias na América Latina (figura 12) (FIRACATIVE *et al.*, 2018).

Figura 12 - Distribuição geográfica dos tipos moleculares de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* na América Latina



Fonte: Firacative *et al.* (2018)

De acordo com recente estudo de Carmo e colaboradores (2022), realizado com dados de 12 estados brasileiros, os genótipos mais prevalentes de isolados clínicos e ambientais são *C. neoformans*VNI (80,07%); 5,73% para *C. neoformans* VNII; 0,17% para *C. neoformans* VNIV e 0,33% para *C. neoformans* VNB. Para *C. gattii*, a prevalência encontrada foi de 0,42% para VGI, 12,79% para VGII e 0,50%

para VGIII.

O tipo molecular VNI encontrado nesse estudo é o mais prevalente em casos de criptococose em Mato Grosso do Sul (NUNES *et al.*, 2018; PASA, 2011; TSUJISAKI, 2013; TSUJISAKI, 2019) e em isolados ambientais (CORRÊA-JUNIOR, 2019).

Devido à ameaça emergente da resistência fúngica a medicamentos antifúngicos licenciados, decorrente da mudança ambiental global e expansão das populações em risco (FISHER, *et al.*, 2022), faz-se necessário o conhecimento de cepas resistentes.

A microbiologia clínica conta com métodos de teste de susceptibilidade antifúngica, que visa determinar o melhor tratamento para um fungo de acordo com a detecção da resistência à antifúngicos (ALASTRUEY-IZQUIERDO; CUENCA-ESTRELLA, 2012). Os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* são padronizados internacionalmente, e os procedimentos de referência do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) possuem um papel fundamental na vigilância de resistência e estudos epidemiológicos (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010).

Os resultados demonstraram que *C. neoformans* isolados de excrementos de pombos de Unidades Básicas de Saúde foram sensíveis a anfotericina B, semelhante ao observado em isolados de excrementos de pombos e outras fontes ambientais em algumas regiões do Brasil (SOARES *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009b; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2016; PUPO, 2019), e como também relatado na região Centro-Oeste brasileira (KOBAYASHI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2010).

Pfaller e colaboradores (2005) observaram em seu estudo de susceptibilidade antifúngica de *C. neoformans* uma resistência global <1% à anfotericina B, flucitosina e fluconazol. Embora a anfotericina B apresenta boa atividade *in vitro* contra *Cryptococcus* spp. e a presença de resistência ser incomum em isolados clínicos e ambientais (PFALLER; LODGE; GHANNOUM, 2010), já foram descritos na literatura *C. neoformans* de fontes ambientais (dentre elas excrementos de pombos) resistentes à AMB (DONGMO *et al.*, 2016; LAHIRI; CHANDRASHEKAR, 2022). Essa característica de resistência é um importante fator de risco especialmente para indivíduos imunocomprometidos, pois eles adquirem a infecção do ambiente e a AMB é o principal fármaco para tratamento da criptococose (DELGADO *et al.*, 2005; LAHIRI; CHANDRASHEKAR, 2022).

A maioria dos isolados de amostras clínicas e ambientais do complexo de espécies de *C. neoformans* da América Latina, revelou susceptibilidade antifúngica do tipo selvagem frente à fluconazol, itraconazol e voriconazol (FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021), no entanto, os isolados VNI do tipo não-selvagens também foram identificados ao mesmos azóis testados. Firacative *et al.*, (2018) enfatizam sobre a importância de *Cryptococcus* spp. não selvagens a agentes antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose na maioria dos países latino-americanos.

Correpondente ao observado em estudos do Brasil com isolados ambientais de *C. neoformans* VNI (CASTRO E SILVA *et al.*, 2015; HERKERT *et al.*, 2018), os isolados deste estudo foram classificados como cepas do tipo selvagem a todos os azóis testados (fluconazol, itraconazol e voriconazol). Apesar de Castro e Silva *et al.*, (2015) terem observado cepas do tipo selvagem, a maioria do isolados (78,9%) foram não-selvagens de acordo com o ECV do fluconazol proposto para VNI (CIM 8mg/L), alertando os pesquisadores para possíveis casos de resistência a antifúngicos entre isolados ambientais, preocupante para populações suscetíveis à criptococose.

Em algumas investigações realizadas em regiões brasileiras dentre elas a Centro-Oeste, utilizando pontos de corte clínicos na interpretação dos testes de susceptibilidade, todos os isolados ambientais de *C. neoformans* mostraram sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e voriconazol (KOBAYASHI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2010; TEODORO *et al.*, 2013; CORRÊA-JUNIOR, 2019).

Ainda que os isolados ambientais de *C. neoformans* VNI desse estudo não apresentaram resistência aos antifúngicos testados, esta já foi descrita a fármacos azólicos e pode ter impacto na terapia de fluconazol nos casos de criptococose (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013; TAKAHASHI *et al.*, 2020). No relato de Soares *et al.* (2005) um isolado de *C. neoformans* var. *grubii* proveniente de excrementos de pombos foi resistente a fluconazol (CIM 64 µg/ml). Da mesma forma, em outro relato do Brasil, um isolado ambiental de *C. neoformans* var. *neoformans* foi resistente ao itraconazol e três exibiram CIMs altas de 16–32 µg/ml contra o fluconazol (COSTA *et al.*, 2009b).

Este fato é de relevância para a área médica e requer aumento da conscientização e subsídios pelas autoridades competentes a fim de controlar os problemas emergentes associados à resistência aos azóis em micoses invasivas. Além disso, é necessário estudo de vigilância para monitorar a emergência de cepas resistentes.

Alguns autores realizam os testes de susceptibilidade antifúngica de *Cryptococcus neoformans* seguindo a padronização EUCAST, e interpretam os valores de CIM com os pontos de cortes estabelecidos pelo CLSI. Estudo comparando os métodos EUCAST e CLSI para AMB, FLC e VCZ contra isolados de *C. neoformans* revelou que a concordância geral entre os métodos foi >72% e >94% em diluições de ± 1 e ± 2 , respectivamente, sugerindo que os métodos de referência possuem uma boa correlação (DELMA, *et al.*, 2020).

Diferenças nas susceptibilidades antifúngicas foram observadas entre diferentes genótipos dos complexos de espécies de *Cryptococcus* (CHONG, *et al.*, 2010).

No Brasil, os dados mostram uma forte correlação entre a susceptibilidade antifúngica e os isolados de *Cryptococcus* spp. dos tipos moleculares VNI, VGI e VGII. Trilles *et al.*, (2012) mostraram que o tipo molecular VNI foi mais suscetível que VGI ao itraconazol e ravuconazol, e mais suscetível que VGII ao itraconazol, ravuconazol, fluconazol, albaconazol, voriconazol e cetoconazol. Não houve diferença nas susceptibilidades dos distintos tipos moleculares para anfotericina. Diante disso, a determinação do tipo molecular pode fornecer informações para decisão da melhor opção de tratamento ao se diagnosticar a criptococose.

8 CONCLUSÕES

Cryptococcus do complexo *C. neoformans* estão presentes em excretas de pombos em 26% das Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS, desse estudo.

Observa-se que *C. neoformans* do tipo molecular VNI é o agente presente em excretas de pombos nas Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande-MS.

Todos os isolados de *C. neoformans* apresentam sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

Profissionais de saúde, trabalhadores e a população que busca atendimento em Unidades Básicas de Saúde podem estar expostos ao *Cryptococcus* spp. circulando no ambiente e, portanto, medidas de controle de pombos minimizam os riscos de adquirir criptococose.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83-91, 2006.
- ABOU-GABAL, M.; ATIA, M. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 16, n. 1, p. 63-68, 1978.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M. EUCAST and CLSI: how to assess *in vitro* susceptibility and clinical resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 3, p. 229-234, 2012.
- ALTAMIRANO, S.; JACKSON, K. M.; NIELSEN, K. The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 10, 2020.
- ALVES, G. S, B. *et al.* Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509-515, 2016.
- ANDRADE-SILVA, L. *et al.* Análise RAPD com o Primer L15996 de Isolados Clínicos e Ambientais Brasileiros de *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 174, p. 53-59, 2012.
- ANDRADE-SILVA, L. *et al.* Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 635-640, 2013.
- ANDRADE-SILVA, L. *et al.* Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, 2018.
- ANZAI, M. C. *et al.* *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymentia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414-418, 2014.
- BARNETT, J. A. *et al.* A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast (Chichester)**, v. 27, n. 11, p. 875-904, 2010.
- BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; LODGE, J. K. Cell wall chitosan is necessary for virulence in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1264-1268, 2011.
- BASTOS, A. L. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico da criptococose associada e não associada à infecção pelo HIV na região Centro-Oeste do Brasil / Clinical and epidemiological aspects of cryptococcosis associated and non-associated to HIV infection in Central Western region of Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 18214-18230, 2022.

BRATTON, E.W. *et al.* Comparison and Temporal Trends of Three Groups with Cryptococcosis: HIV-Infected, Solid Organ Transplant, and HIV-Negative/Non-Transplant. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

BRIZENDINE, K. D; BADDLEY, J.W; PAPPAS, P.G. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

CALVO, E. *et al.* Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4074-4077, 2010.

CAMPO GRANDE. **Lei Complementar nº 345, de 18 de Janeiro de 2019. Altera a Lei Complementar nº 148, de 23 de dezembro de 2009.** Institui o Código Sanitário Municipal no âmbito do Município de Campo Grande-MS e dá outras providências. Campo Grande: Câmara Municipal, [2019]. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=374112>. Acesso em: 18 Ago. 2022.

CARMO, F. N. *et al.* *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-17, 2022.

CASADEVALL, A. *et al.* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822-831, 2019.

CASALI, A. K. *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast research**, v. 3, n. 4, p. 405-415, 2003.

CASTRO E SILVA, D. M. *et al.* First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 97-102, 2015.

CHERNIAK R.; REISS E.; TURNER S. A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Carbohydrate Research**, v. 103, n. 2, p. 239–250, 1982.

CHERNIAK, R.; JONES, R. G.; REISS, E. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ¹³C-nmr spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 172, n.1, p.113-138, 1988.

CHONG, H. S. *et al.* *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4115-4120, 2010.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, p. 1-23, 2013.

COGLIATI, M. *et al.* Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 4, 2016.

COGLIATI, M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* species complex isolates living in a

treemicro-ecosystem. **Fungal Ecology**, v. 44, p. 100889, 2020.

CORRÊA-JÚNIOR, D. **Investigação de *Cryptococcus* spp. em excrementos de pombos no ambiente escolar em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2019.

COSTA, S. P. *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662-664, 2009a.

COSTA, A. K. F. *et al.* Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 207-213, 2009b.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1782-1786, 2010.

DANESI, P. *et al.* *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2021.

DENNING, D. W. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150468, 2016.

DELMA, F. Z. *et al.* Comparison of MIC Test Strip and Sensititre YeastOne with the CLSI and EUCAST broth microdilution reference methods for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. e02261-19, 2020.

DELGADO, A.C.N. *et al.* Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, n. 1, p. 7-11, jan. 2005.

DINIZ-LIMA, I. *et al.* *Cryptococcus*: History, Epidemiology and Immune Evasion. **Applied Sciences**, v. 12, n. 14, p. 7086, 2022.

DONGMO, W. *et al.* *In vitro* Antifungal Susceptibility of Environmental Isolates of *Cryptococcus* spp. from the West Region of Cameroon. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, v. 26, n. 6, p. 555-4, 11 nov. 2016.

EDWARDS, H. M. *et al.* The need for environmental surveillance to understand the ecology, epidemiology and impact of *Cryptococcus* infection in Africa. **FEMS microbiology ecology**, v. 97, n. 7, p. fiab093, 2021.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents**. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, (EUCAST Definitive document E.DEF 7.3.2), 2020

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures**. v. 3, 2022.

ESPINEL-INGROFF A, A. A. I. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 11, 2012.

FAVALESSA, O. C. *et al.* Molecular typing and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 1037-1043, 2014.

FARIA, R.O. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p.198-200, 2010.

FELDMESSER M.; KRESS Y.; CASADEVALL A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology (Reading)**, v. 147, n. 8, p. 2355-2365, 2001.

FERREIRA-PAIM, K. *et al.* Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e294-e300, 2011.

FERRER, C. *et al.* Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873-2879, 2001.

FILIÚ, W. F. O. *et al.* Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 591-595, 2002.

FIRACATIVE, C. *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.

FIRACATIVE, C; MEYER, W; CASTAÑEDA, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Latin America: a map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 282, 2021.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. Recent Advances in *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 13, 23 dez. 2021.

FISHER, M. C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-15, 2022.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.

FRASER, J. A. *et al.* Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360-1364, 2005.

GEORGE I.A. *et al.* Comparative epidemiology and outcomes of human immunodeficiency virus (HIV), non-HIV non-transplant, and solid organ transplant associated cryptococcosis: a population-based study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, 2018.

GUESS, T. E. *et al.* An inherent T cell deficit in healthy males to *C. neoformans* infection may begin to explain the sex susceptibility in incidence of cryptococcosis. **Biology of sex Differences**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919-934, jun. 2013.

HAGEN, Ferry *et al.* Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1618, 2012.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HAYASHIDA, M. Z. *et al.* Disseminated cryptococcosis with skin lesions: report of a case series. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, p. 69-72, 2017.

HEITMAN, J. *et al.* ***Cryptococcus: from human pathogen to model yeast***. ASM press, 2011.

HERKERT, P. F. *et al.* Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* sensu stricto from southern Brazil. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 560-569, 1 abr. 2018

IBAMA. Instrução Normativa IBAMA nº 141, de 19 de dezembro de 2006. Regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. DOU 20/12/2006. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=76583>. Acesso em: 10/07/2022.

IBGE. População estimada. 2021. Disponível em:

<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/campo-grande/panorama>. Acesso em: 09 ago. 2022.

ISLAM, N. *et al.* Occurrence and Distribution of *Cryptococcus* Species in Environmental Sources of Lower Assam Belt of India. **J Pure Appl Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 2781- 2800, 2020.

JEWELL, B. L. *et al.* Potential effects of disruption to HIV programmes in sub-Saharan Africa caused by COVID-19: results from multiple mathematical models. **The lancet HIV**, v. 7, n. 9, p. e629-e640, 2020.

JOHNSTON, S. A.; VOELZ, K.; MAY, R. C. *Cryptococcus neoformans* thermotolerance to avian body temperature is sufficient for extracellular growth but not intracellular survival in macrophages. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

KAMARI, A.; SEPAHVAND, A.; MOHAMMADI, R. Isolation and molecular characterization of *Cryptococcus* species isolated from pigeon nests and Eucalyptus trees. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 2, p. 20, 2017.

KHAN, Z. U. *et al.* Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 271-275, 2003.

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, Dec. 2004.

KNEALE, M. *et al.* Global access to antifungal therapy and its variable cost. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3599-3606, 2016.

KOBAYASHI, C. C. B. A. *et al.* Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203-207, ago. 2005.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, n. 4, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, K. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 574-587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**,

v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Msphere**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2017.

LABANHARE, L.L.; PERRELLI, M.A. S. Pombos urbanos: Biologia, ecologia e métodos de controle populacional. **Multitemas**, n.35, p. 225-235, dez., 2007.

LAHIRI, S.; CHANDRASHEKAR, N. Advanced approach for antifungal susceptibility and characterization of resistance properties in clinical and environmental isolates of *Cryptococcus* species complex. **Infectious Medicine**, p. 1-2, ago. 2022.

LAZÉRA, M. S. *et al.* Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*—evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v. 36, n. 2, p. 119-122, 1998.

LAZÉRA, M. S. *et al.* Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379-383, 2000.

LEAL, A. L. *et al.* *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. **Medical Mycology**, v. 46, n. 4, p. 377-383, 2008.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994-2004. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2582-2592, 2008.

LI, W. *et al.* Genetic diversity and genomic plasticity of *Cryptococcus neoformans* AD hybrid strains. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 2, n. 1, p. 83-97, 2012.

LIAO, C. H. *et al.* Different presentations and outcomes between HIV-infected and HIV-uninfected patients with Cryptococcal meningitis. **Journal of Microbiology**, v. 45, 2012.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LIN, Y.Y.; SHIAU, S.; FANG, C.T. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p.e0119090, 2015.

LITVINTSEVA, A. P. *et al.* Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2223-2238, 2006.

LOMES N. R. *et al.* Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Medical Mycology**, v. 54, 2016.

MADURO, A.P. *et al.* HIV/AIDS-associated cryptococcosis in Portugal spanning the pre-to post-HAART era: a retrospective assessment at the genotypic level based on *URA5-RFLP*. **Current Microbiology**, v. 71, n. 4, p.449-457, 2015.

MARANHÃO, F. C. A. *et al.* Disseminated and cutaneous cryptococcosis by *C. neoformans* VNI in an immunocompetent patient. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

MASCARENHAS, J.; BELGAS, L. B. Os Pombos Urbanos e a Degradação De Edifícios. **Revista de Geistória e Pré-História**, p. 63-65, 2018.

MATSUMOTO, M. T. *et al.* Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 41-47, fev. 2007.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. The spectrum of interactions between *Cryptococcus neoformans* and bacteria. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 31, 2019.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MEYER, W. *et al.* Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189-195, fev. 2003.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* species complex. **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**, p. 327-357, 2010.

MICALLEF, C. *et al.* Introduction of an antifungal stewardship programme targeting high-cost antifungals at a tertiary hospital in Cambridge, England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1908-1911, 2015.

MOLLOY, S. F. *et al.* Cryptococcal meningitis: A neglected NTD?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005575, 2017.

MOMIN, M.; WEBB, G. The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 1-14, 2021,

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Medical mycology**, v. 38, n. 5, p. 385-390, 2000.

MOTOA, G. *et al.* Increased cryptococcal meningitis mortality among HIV negative, non-transplant patients: a single us center cohort study. **Therapeutic Advances In**

Infectious Disease, v. 7, 2020.

MUKAREMERA, L. *et al.* Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **The Cell Surface**, v. 1, p. 15-24, 2018.

MCCLELLAND, E. E., *et al.* The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63632, 2013.

NAKAMURA, Y. *et al.* Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium: *Cryptococcus neoformans*-Isolate Serotyp A und D auf Canavanin-Glycin-Bromthymolblau-Medium. **Mycoses**, v. 41, n. 1-2, p. 35-40, 1998.

NIMER, E. 1989. Climatologia do Brasil Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

NUNES, J. O. *et al.* Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a state of the brazilian pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 485-492, 2018.

NOSANCHUK, J. D. *et al.* Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **The Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2049-2050, 2000.

OMS. Organização Mundial da Saúde: Doenças Tropicais Negligenciadas. 2018. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 10 ago. 2022.

OKAGAKI, L. H. *et al.* Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010.

PAPPAS PG. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical Climatological Association**, v. 124, p 61-79, 2013.

PASA, C. R. **Tipagem molecular e suscetibilidade de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2011.

PARK, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PATTERSON, T. F. *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.

PERFECT, John R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PUPO, H. D. *et al.* Polysaccharide diversity in VNI isolates of *Cryptococcus neoformans* from Roraima, Northern Brazil. **Fungal Biology**, v. 123, n. 10, p. 699-708, 2019.

PFALLER, M. A. *et al.* Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163-2167, 2005.

PFALLER, M. A.; LODGE, J. K.; GHANNOUM, M. A. Drug resistance in *Cryptococcus*: epidemiology and molecular mechanisms. **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**, p. 203-216, 2010.

RAJASINGHAM, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RATHORE, S. S. *et al.* A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, p. 105521, 2022.

REICHERT-LIMA, F. *et al.* Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 585-593, 2016.

REVENGA, F. *et al.* Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host: case report and review of the literature. **Dermatology**. 2002.

RIBAS, R. C.; BAEZA, L. C.; RIBEIRO, F. H. M. Isolation of *Cryptococcus* spp. In excrements of pigeons (*Columba* spp.) In the Maringá city, Pr, Brazil. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 45-50, 2011.

RODRIGUES, M. L. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.3, p. e0004429, 2016.

RODRIGUES, M. L. Neglected disease, neglected populations: the fight against *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.

ROSARIO, I., *et al.* Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 421-424, 2005.

ROSARIO, Inmaculada; ACOSTA, Begona; COLOM, M. Francisca. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. S13-8, 2008.

SABATELLI, F. *et al.* *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009-2015, 2006.

SANTOS, E. F.; FIGUEIREDO, E. F. Criptococose: consequência da infecção por

Cryptococcus neoformans em pacientes com AIDS no Brasil. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 15, p. e150101522591, 2021.

SETHI, K. K.; RANDHAWA, H. S. Survival of *Cryptococcus neoformans* in the gastrointestinal tract of pigeons following ingestion of the organism. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 135-138, 1968.

SIQUEIRA, N. P. *et al.* Domestic Birds as Source of *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII): potential risk for cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 1, p. 103-111, 2022.

SOARES, M. C. B. *et al.* Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety grubii in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 31-36, 2005.

SOARES, E. A. *et al.* Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: a descriptive epidemiological study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 0007569-4, 29 jul. 2019.

SOUZA, L. K. H. *et al.* Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 62-67, 2010.

SOUZA, L. K. H. *et al.* Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 343-347, 2013.

SPINA-TENSINI, T. *et al.* Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 51-58, 2017.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014.

TAHA, M. *et al.* Molecular Typing and Susceptibility Profile of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species Complex: An updated Review. **Journal Of Animal Health And Production**, v. 9, n. 1, p. 17-26, maio 2020.

TAKAHASHI, J. P. F. *et al.* Could fungicides lead to azole drug resistance in a cross-resistance manner among environmental *Cryptococcus* strains?. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, n. 1, p. 9-14, 2020.

TAKAHARA, D. T. *et al.* First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 371-376, 2013.

TEODORO, V. L. L. *et al.* Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 759-764, 2013.

- TRILLES, L. *et al.* Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v. 41, n. 5, p. 383-390, 2003.
- TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.
- TRILLES, L. *et al.* Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v. 50, n. 3, p. 328-332, 2012.
- TSUJISAKI, R. A. S. *et al.* First molecular typing of cryptococemia-causing *Cryptococcus* in central-west Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 267-272, 2013.
- TSUJISAKI, R. A. de S. **Estudo clínico-epidemiológico e molecular dos agentes da criptococose no Mato Grosso do Sul**. 2019. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2019)
- WALSH, N. M. *et al.* Infectious particle identity determines dissemination and disease outcome for the inhaled human fungal pathogen *Cryptococcus*. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, p. e1007777, 2019.
- WANG, J. M. *et al.* Clinicopathological features of pulmonary cryptococcosis with cryptococcal titan cells: a comparative analysis of 27 cases. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 8, p. 4837, 2014.
- ZARAGOZA, O. *et al.* Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000945, 2010.
- ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.
- ZARRIN, M. *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 313-316, 2010.

**ANEXO A – Autorização legal da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande,
Mato Grosso do Sul**



PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE
ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL

TERMO DE RESPONSABILIDADE E AUTORIZAÇÃO

A Secretaria Municipal de Saúde autoriza a pesquisa proposta pela pesquisadora, profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang, inscrita no CPF/MF sob n°. 290226811-9, portadora do documento de identidade sob n° 027730, residente e domiciliado à Rua. Uricuri, n° 582, bairro Vila Olinda, nesta Capital, telefone nº(67) 9921-15200, pesquisadora do Programa de Pós graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com o título do projeto de pesquisa **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE CRYPTOCOCCUS SPP. PROVENIENTES DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DE CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL** o pesquisador firma o compromisso de manter o sigilo das informações acessadas do banco de dados da Secretaria Municipal de Saúde Pública, assumindo a total responsabilidade por qualquer prejuízo ou dano à imagem dos pacientes cadastrados na SESAU.

Fica advertida de que os nomes e/ou qualquer referência aos dados do paciente devem ser mantidos em sigilo, não podendo em hipótese alguma serem divulgados, devendo ser consultada a gerência da unidade de saúde sobre quaisquer referências aos dados analisados.

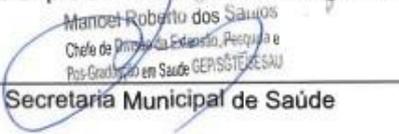
Considerando que a pesquisa não envolve seres humanos a mesma foi dispensada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Vale ressaltar que a visita restringir-se-á somente a observação e coleta de amostras ambientais não sendo permitida fotos de pessoas e/ou procedimentos.

Após a conclusão, o acadêmico deverá entregar uma cópia para esta Secretaria.

Campo Grande, 10 de dezembro de 2020.


Pesquisadora: profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang


Manoel Roberto dos Santos
Chefe de Divisão de Extensão, Pesquisa e
Pós-Graduação em Saúde GER/SISTE/SESAU

Secretaria Municipal de Saúde